

Jab1結合部位を欠失したp27kip1 組み込みアデノウイルスベクターは癌細胞株に対し細胞障害性を増強する

著者	白相 悟
号	2090
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22635

氏 名（本籍）	白 相 悟
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2090 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	Adenovirus Expressing p27 ^{kip1} Deleted Jab1 Binding Lesion Enhances Cytotoxicity against Cancer Cell Lines (Jab1結合部位を欠失した p27 ^{kip1} 組み込みアデノ ウイルスベクターは癌細胞株に対し細胞障害性を 増強する)
	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀 教授 大 内 憲 明 教授 工 藤 俊 雄

論文内容要旨

Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor である $p27^{kip1}$ は CDK 活性を抑制することで細胞周期を負に制御し、細胞増殖を抑制する。また、個体発生における器官形成や細胞の癌化抑制においても重要な働きをしており、乳癌、肺癌、胃癌など多くの腫瘍において、 $p27^{kip1}$ の発現量の低下とその悪性度に強い相関が認められている。ところが、癌細胞における $p27^{kip1}$ の遺伝子変異はほとんど見られないことから、これら予後不良の癌では $p27^{kip1}$ の分解活性が亢進していると考えられており $p27^{kip1}$ の分解調節機構が注目されている。その分解機構はすべて解明されたわけではないが、 $p27^{kip1}$ の分解には、cyclin/CDK complex によるリン酸化、SCF complex を介したユビキチン化とプロテアソームによる分解、そして細胞内局在の変化が重要であるとされる。そのうちの一つである細胞内局在に影響をあたえる分子として Jab1 (Jun activating binding protein) が報告されている。 $p27^{kip1}$ が CDK inhibitor として働くためには核内に存在することが必要であるが、核内の $p27^{kip1}$ は Jab1 と結合して細胞質へ運ばれそこで分解が促進される。また、 $p27^{kip1}$ と Jab1 の発現が乳癌において相関することが報告されている。

我々は、これまでにアデノウイルスに $p27^{kip1}$ を組み込んだ (Adp27-wt) が、 $p53$ の変異に係わらず癌細胞に apoptosis を誘導することを示し、癌遺伝子治療に広く応用できる可能性を示してきた。そして、 $p27^{kip1}$ のアミノ酸 187 番目のスレオニンをメチオニンに変換して、ユビキチン化による分解を抑制した変異型 $p27^{kip1}$ を組み込んだアデノウイルス (Adp27-mt) が、野生型 $p27^{kip1}$ を組み込んだ Adp27-wt よりさらに apoptosis を増強し、 $p27^{kip1}$ の分解を抑制することで抗腫瘍効果が高まった。しかし、Adp27-mt は MDA-MB-231 (乳癌細胞株) では抗腫瘍効果の増強がみられたものの、TFK-1 (胆管癌細胞株) ではその効果は不十分であった。そこで今回私は、さらに $p27^{kip1}$ を安定化させるため Jab1 を介した核外輸送に着目し、Jab1 結合領域を欠損させた $p27^{kip1}$ を発現するアデノウイルス (Adp27-Jab-d) を開発しその抗腫瘍効果を主に TFK-1 細胞株で検討した。

$p27^{kip1}$ の発現は Western blot で確認された。その発現量に増加は認めなかったが、 $p27^{kip1}$ の蛋白安定性を野生型 $p27^{kip1}$ ($p27^{kip1}$ (p27-wt)) と比較したところ、p27-wt が 1.5 時間の半減期であるのに対し、p27-jab-d は 2.7 時間に延長し、蛋白の安定性が増していることが確認された。MTT アッセイでは、Adp27-jab-d、Adp27-mt、Adp27-wt の順に抗腫瘍効果の増強を認め、Adp27-jab-d は IC₅₀ 値で Adp27-wt の 4.6 倍の抗腫瘍効果を認めた。さらに、その細胞傷害性の増強が apoptosis によるものかどうかを各種 apoptosis アッセイにて検討した。その結果、sub-G1 比率の著明な増加 (Adp27-wt が 18.5% に対し Adp27-jab-d では 33%) と、PARP の Western blot における、apoptosis の指標である cleavage バンドの増加がみられ、apoptosis の誘導が示唆された。しかし、TUNEL では apoptosis の誘導は認めるものの、Adp27-mt ほど apoptosis

は増強しておらず、Adp 27-jab-d は apoptosis のみならず necrosis 作用も誘導することにより抗腫瘍効果を高めていると考えられた。p 27-jab-d は cyclin/CDK の結合部位は保存されているが、97-151 番目のアミノ酸を欠失した p 27^{kip1} であり、CDK inhibitor として p 27-jab-d が機能していることを cdc2 kinase assay, Rb のリン酸化及び細胞周期で検討した。細胞周期では Adp 27-wt, Adp 27-mt, Adp 27-jab-d とともに S 期が低下し、細胞周期の停止が確認された。また Western blot にて Rb のリン酸化抑制を同等に認め、cdc2 kinase 活性も著明に減少しており、CDK inhibitor としての機能が確認された。p 27-jab-d は Jab1 と結合しないため、核内から細胞質への輸送が抑制されていると考えられるが、p 27^{kip1} の細胞内局在の免疫染色では、Adp 27-jab-d は Adp 27-wt と同様に p 27^{kip1} の強発現が確認され、その局在に違いはなかったが膨化した細胞が多く、necrosis が示唆された。さらに SCID mouse を用いた胆管癌皮下腫瘍モデルでは有意に抗腫瘍効果の増強が確認された。また、非腫瘍細胞に対する影響をヒト線維芽細胞 WI-38 で検討した。細胞周期、sub-G1 比率では変化が少なかった。MTT assay では、Adp 27-jab-d は非腫瘍細胞に対しても細胞傷害性が高かったが、10 pfu/cell 以下のウイルス量では傷害性は認めなかった。これは、WI-38 が細胞周期における G0-G1 期に多いため、分裂の盛んな癌細胞に比べ細胞周期抑制による効果が少ないためと考えられた。さらに、各種癌細胞における Jab1 と p 27^{kip1} の発現とウイルスの細胞傷害性の関連性を検討した。Jab1 が強く発現する細胞株では p 27^{kip1} が減少している傾向が認められ、内在性に p 27^{kip1} を発現している細胞株では Adp 27-mt は Adp 27-wt より細胞傷害性を増強しなかった。これは内在性に p 27^{kip1} を発現している細胞株では p 27^{kip1} が発現していても細胞が増殖する機構が存在し、そのために Adp 27-mt によって p 27^{kip1} の発現を強化しても細胞傷害性が増強されなかったと考えられる。一方 Adp 27-jab-d はこれら内在性に p 27^{kip1} を発現している細胞株においても細胞傷害性を増強していた。この事実は Adp 27-jab-d が、p 27 発現による apoptosis だけでなく necrosis のような別の機序も誘導して細胞傷害性を高めているという TUNEL での検討に一致する。そして、その機序を探るべく、apoptosis 経路の一つである Fas, FasL 及び cyclin B, D を検討したが、その機序の解明には至らなかった。

以上より、Adp 27-jab-d は apoptosis に加え necrosis も誘導することで抗腫瘍効果を高める。これは低ウイルス量で、同程度の細胞傷害を癌細胞に誘導することになり、ウイルスによる副作用の軽減に繋がり、Adp 27-jab-d は癌治療に有効であると考えられる。

審査結果の要旨

p27^{kip1} は CDK 活性を抑制することで細胞周期を負に制御し、細胞増殖を抑制する。また、個体発生における器官形成や細胞の癌化抑制においても重要な働きをしており、乳癌、肺癌、胃癌など多くの腫瘍において、p27^{kip1} の発現量の低下とその悪性度に強い相関が認められている。p27^{kip1} の分解には、SCF complex を介したユビキチン化とプロテアソームによる分解、そして細胞内局在の変化が重要であるとされる。そのうちの一つである細胞内局在に影響をあたえる分子として Jab1 (Jun activating binding protein) が報告されている。p27^{kip1} が CDK inhibitor として働くためには核内に存在することが必要であるが、核内の p27^{kip1} は Jab1 と結合して細胞質へ運ばれそこで分解が促進される。当教室ではこれまでにアデノウイルスに p27^{kip1} を組み込んだ (Adp27-wt) が、p53 の変異に係わらず癌細胞に apoptosis を誘導することを示し、癌遺伝子治療に広く応用できる可能性を示してきた。そこで本研究では、さらに p27^{kip1} を安定化させるため Jab1 を介した核外輸送に着目し、Jab1 結合領域を欠損させた p27^{kip1} を発現するアデノウイルス (Adp27-Jab-d) を開発しその抗腫瘍効果を検討した。

p27-jab-d は野生型 p27^{kip1} (p27-wt) に比べて半減期が延長し、蛋白の安定性が増していることが確認された。MTT アッセイでは抗腫瘍効果の増強を認め、Adp27-jab-d は IC50 値で Adp27-wt の 4.6 倍の抗腫瘍効果を認めた。さらに、その細胞傷害性の増強が apoptosis によるものかどうかを各種 apoptosis アッセイにて検討した結果、sub-G1 比率の著明な増加、PARP の cleavage バンドの増加がみられ、apoptosis の誘導が示唆されたが、TUNEL では apoptosis はそれほど増強しておらず Adp27-jab-d は apoptosis のみならず necrosis 作用も誘導することにより抗腫瘍効果を高めていると考えられた。また、CDK inhibitor として p27-jab-d が機能していることは cdc2 kinase assay, Rb のリン酸化及び細胞周期で確認された。p27^{kip1} の免疫染色では p27^{kip1} の強発現が確認され、また、膨化した細胞が多く、necrosis が示唆された。さらに SCID mouse を用いた胆管癌皮下腫瘍モデルでは有意に抗腫瘍効果の増強が確認された。そして非腫瘍細胞に対する影響は少ないことが確認された。

本研究は、蛋白の安定化をはかった Adp27-jab-d が、野生型の Adp27-wt よりも抗腫瘍効果が高めることを示したもので、これは低ウイルス量で、同程度の細胞傷害を癌細胞に誘導することになり、ウイルスによる副作用の軽減に繋がる。癌の遺伝子治療への応用に寄与するものであり、学位論文に値する重要な研究といえる。